

Експресія генів хіміорезистентності в гліомах головного мозку різного ступеня злоякісності

І.Г.Васильєва, В.Д.Розуменко, О.Я.Главацький, Н.Г.Чопик,
Н.П.Олексенко, О.С.Галанта, О.І.Цюбко

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова АМНУ»
(директор — академік НАН та АМН України Ю.П.Зозуля)
Київ, Україна

Метою роботи було дослідити особливості функціонування основних систем хіміорезистентності гліом головного мозку різного ступеня злоякісності для оцінки можливості їх врахування при розробці ефективних методів лікування пацієнтів з даною патологією. Проведено дослідження генотипів глутатіонтрансфераз класів μ та θ , а також рівня експресії генів MDR1, MRP, LRP, GSTP1, MGMT у гліомах головного мозку (астроцитомах фібрилярно-протоплазматичних, астроцитомах анапластичних, гліобластомах) з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції. Отримані результати вказують на зростання рівня експресії генів MDR1, MRP, LRP, GST-P та MGMT у гліальних пухлинах з високим ступенем анаплазії порівняно з низькозлоякісними гліомами. Найбільш високий рівень експресії генів MDR1, MRP, LRP та GST-P виявлено для анапластичних астроцитом (III), гена MGMT — для гліобластом (IV). Аналізуючи отримані дані, слід зазначити, що найбільша ефективність лікування гліом головного мозку як низько-, так і високозлоякісних може бути досягнута при врахуванні всіх можливих механізмів резистентності організму індивідуально для кожного пацієнта.

Ключові слова: гліоми, астроцитоми, гліобластоми, головний мозок, хіміорезистентність.

ВСТУП

Проблема лікування злоякісних гліом головного мозку є однією з найскладніших у сучасній нейроонкології. Незважаючи на комплексний підхід у лікуванні даної категорії пацієнтів (поєднання хірургічного оперативного втручан-

ня з післяопераційною променевою та хіміотерапією, використання нових схем та шляхів доставки антибластних препаратів), значного прогресу у виживанні хворих не одержано. Короткочасний ефект хіміотерапії обумовлений, у першу чергу, наявністю первинної та розвитком вторинної або набутої хіміорезистентності. Встановлено, що наявність чи відсутність у пухлинних клітинах певних молекулярних маркерів призводить до того, що пухлини, які мають однакову стадію за класифікацією TNM, відрізняються за агресивністю перебігу захворювання та чутливістю до протипухлинної терапії, що ускладнює вибір оптимального лікування для конкретного хворого.

Загибель пухлинної клітини під дією протипухлинних препаратів контролюється певними регуляторними системами клітини. У зв'язку із цим рівень експресії того чи іншого гена може бути визначальним у формуванні чутливості пухлинної клітини до пошкоджуючого агента. Феномен клітинної резистентності до хіміопрепаратів включає: 1) зміни транспорту препарату через плазматичну мембрану, що призводить до зменшення накопичення цитостатика в клітині; 2) підвищену активність детоксикуючих систем (зокрема глутатіону); 3) посилену репарацію ДНК; 4) зміни рівня експресії генів апоптоза та ін. [2].

Першим етапом на шляху реалізації цитотоксичного ефекту протипухлинних препаратів є їх взаємодія з плазматичною мембраною пухлинної клітини. Так, часто на поверхні стійких до дії хіміопрепаратів пухлинних клітин спостерігається гіперекспресія АТФ-залежних транспортних білків, які беруть участь у виведенні цитостатиків з клітини, а саме: трансмембранного Р-глікопротеїду (Р-gp, Р-170) — продукту гена MDR1, протеїну з молекулярною масою 190 кД, асоційованого з множинною стійкістю до ліків, — продукт гена MRP [13], а також білка з молекулярною масою 11 кД, асоційованого з множинною стійкістю до ліків пухлин легень (LRP) [12].

Іншими, не менш важливими механізмами формування резистентності є певні ферментативні системи захисту організму, одне з найважливіших місць серед яких посідає ферментна система глутатіон-S-трансфераз (GST) [7], цитозольні ізоформи якої представлені класами α , μ , π , θ , σ , κ , та ζ . Генетичні відмінності в експресії та активності ферментів GST пов'язані з наявністю поліморфних алелів, які кодують ці ферменти. Проте, як показано, тільки деякі випадки генетичного поліморфізму ізоензимів пов'язані з канцерогенезом [9, 15], а саме: генні делеції глутатіон-S-трансфераз μ (GSTM1*0), θ (GSTT1*0) та мутації глутатіон-S-трансфераз π (GSTP1*B) (Ile¹⁰⁵ Val).

Ще одним механізмом формування резистентності до хіміопрепаратів, як зазначалося вище, є посилена репарація ДНК-аддуктів [17]. Алкілювання ДНК в O⁶-положенні є важливим кроком у виникненні мутацій при канцерогенезі, головним чином, шляхом утворення пар між O⁶-метилгуаніном та тиміном під час реплікації, що призводить до заміни гуанін-цитозин пари та аденін-тимін пари [4]. Фермент ДНК-O⁶-алкілгуанін-ДНК-алкілтрансфераза, відомий також як O⁶-метилгуанін-ДНК-метилтрансфераза (MGMT), захищає клітини від таких пошкоджень шляхом видалення алкільних груп з O⁶-гуаніну в ДНК та перенесення їх на активний цистеїн, що входить до послідовності самого ферменту. Відомо, що більшість препаратів проявляють свій цитотоксичний ефект шляхом утворення внутрішньоланцюгових зшивок ДНК. Ці зшивки призводять до загибелі клітин, якщо вони своєчасно не підлягають репарації та елімінації. Стійкість до цитостатиків корелює з експресією в пухлинних клітинах ензиму репарації MGMT, який видаляє алкільні аддукти з O⁶-позиції гуаніну до того, як відбувається формування зшивки, тим самим перешкоджаючи цитотоксичному ефекту препарату [11].

Таким чином, наведені дані про механізми формування стійкості пухлинних клітин до ліків свідчать про складність та багатогранність цієї проблеми, а отже, всебічний аналіз рівня експресії генів MDR1, MRP, LRP, GSTP1, MGMT, а також генотипів пухлин головного мозку відносно генів GSTM1, GSTT1 у гліомах головного мозку різного ступеня злоякісності може бути корисний у плані прогнозу чутливості пухлинних клітин до ліків та вдосконалення хіміотерапії хворих.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Тканину пухлини (66 зразків: 10 астроцитом фібрилярно-протоплазматичних I-II ступе-

ня злоякісності, 19 астроцитом анапластичних III ступеня злоякісності, 37 гліобластом IV ступеня злоякісності) безпосередньо після видалення заморожували в рідкому азоті і в такому вигляді зберігали до моменту використання.

Геномну ДНК виділяли зі зразків пухлин мозку з використанням наборів «ДНК-сорб В» («Амплісенс», Росія). Екстракцію РНК здійснювали фенольною обробкою гомогенату в присутності детергентів та інгібіторів нуклеаз [1]. Розчиняли нуклеїнові кислоти у воді або буфері і зберігали при -70°C. Вихід та чистоту препарату РНК оцінювали за поглинанням проби при 260 нм та 280 нм. кДНК синтезували з використанням 1-2 мкг РНК та 100 нг оліго(дТ)₁₂₋₁₈, а також 200 од М-Mlv зворотної транскриптази (рекомбінантної). Суміш інкубували протягом 1 год. при 60°C. 5 мкл кДНК використовували в реакції ампліфікації.

Генотипування GSTM1 та GSTT1 здійснювали шляхом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням праймерів 5'-GAGATGAAGTCCTTCAGA-3' та 5'-GCTTCACGTGTTATGGAGGTT-3' для GSTM1, 5'-ATGTGACCCTGCAGTTGC-3' та 5'-GAGATGTGAGCACCAGTAAGGAA-3' для GSTT1 [14]. 40 циклів ампліфікації було здійснено при температурі відпалу 58°C. Візуалізація продуктів (151 п.н. для GSTM1 та 70 п.н. для GSTT1) проводилася за допомогою електрофорузу в 2% агарозному гелі. Відсутність амплікону свідчила про делецію досліджуваного гена.

ПЛР-реакція зі зворотною транскрипцією для визначення експресії MDR1 була виконана з використанням праймерів 5'-CCCATCATTTGCAATAGCAGG-3', 5'-GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA-3' [10], для MRP — 5'-TGGGACTGGAATGTCACG-3', 5'-AGGAATATGCCCCGACTTC-3', для LRP — 5'-GTCTTCGGGCTGAGCTGGTGTGCG-3' та 5'-CTTGCCGTCTCTTGGGGGTCCTT-3' [18], для GST-P1 — 5'-GGGCAGTGCCTTCACATAGT-3' та 5'-GGAGACCTCACCTGTACCA-3' [3], для MGMT — 5'-GCCGGCTCTTCACCATCCCCG-3' та 5'-GCTGCAGACCACTCTGTGGCAGC-3' [20]. Ампліфікація здійснювалася при температурі відпалу 55°C для MDR1, 53°C для MRP та LRP, 60°C для GSTP1 та 50°C для MGMT. Продукти ампліфікації становили 167 п.н., 240 п.н., 260 п.н., 198 та 210 п.н. для MDR1, MRP, LRP, GSTP1 та MGMT відповідно.

Експресію визначали за інтенсивністю світильних полос, обробка даних здійснювалася з використанням програмного забезпечення ViTan та MS-Excel. Статистичну обробку даних проводили з використанням U-критерію Манна-Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення експресії MDR1, MRP та LRP в пухлинах головного мозку. Феномен множинної стійкості до ліків тісно пов'язують, у першу чергу, зі змінами транспорту препарату через плазматичну мембрану, що призводить до зменшення накопичення цитостатика в клітині. Відповідальними за цей етап формування пухлиною клітинної хіміорезистентності вважають продукти генів MDR1, MRP та LRP.

Проведені дослідження наявності експресії цих генів у пухлинах головного мозку (45 зразків) дали позитивний результат для більшості вивчених зразків, за винятком небагатьох із них (рис. 1а, табл. 1). Як свідчать отримані дані, серед гліом різного ступеня анаплазії найбільш високий рівень експресії всіх 3 генів (MDR1, MRP та LRP) виявляється для астроцитом анапластичних (III). Для астроцитом з низьким рівнем анаплазії (II) і навіть гліобластом (IV) рівень експресії цих генів був значно нижчий (в 1,5-4,0 разу порівняно з попередньою групою).

Повна відсутність експресії генів, які кодують транспортні протеїни, вказує на очікувану високу проникність певних препаратів (які є субстратами MDR1, MRP чи LRP) через плазматичну та ядерну мембрани пухлинних клітин. Проте зразків з відсутністю експресії того чи іншого із досліджуваних генів виявлялася незначна кількість: 2 із 8 зразків астроцитом фібрилярно-протоплазматичних (II) та 2 із 13 зразків астроцитом анапластичних (III) демонстрували відсутність експресії гена MRP. Серед 24 гліобластом (IV) у 6 та 13 зразках нульовий рівень експресії був виявлений відповідно для генів MDR1 та MRP. Однак жодного зразка з повною відсутністю експресії всіх 3 генів, що експресують АТФ-залежні транспортні білки, які беруть участь у виведенні цитостатиків з кліти-

ни, серед гліом головного мозку нами виявлено не було.

Про зазначені відмінності щодо експресії генів MDR1, MRP та LRP гліомами різного ступеня анаплазії можна говорити лише як про тенденцію, оскільки в усіх досліджених групах гліом головного мозку мали місце зразки як з низьким рівнем експресії даних генів (навіть з повною її відсутністю), так і з високим рівнем. Тому нами було використано ще один критерій для поділу зразків пухлин головного мозку на групи з високим та низьким рівнем експресії MDR1, MRP та LRP у залежності від середніх значень, що визначалися для цих генів [18]. Пухлини, для яких значення досліджуваних показників були нижчі за середні (у цілому серед гліом головного мозку), розглядалися як зразки з низькою експресією, а пухлини зі значеннями, що перевищували медіану, — як зразки з високим рівнем експресії генів. Згідно із цим критерієм, гліоми різного ступеня злоякісності розділилися наступним чином: серед астроцитом фібрилярно-протоплазматичних (II) та гліобластом (IV) переважали зразки з низьким рівнем експресії генів MDR1, MRP та LRP (62,5-75% та 79,2-87,5% відповідно), у той час як серед астроцитом анапластичних (III) значно переважала кількість пухлин з високим рівнем експресії досліджуваних генів (69,2-76,9%). Зразки з низьким рівнем експресії всіх 3 генів АТФ-транспортів зустрічалися у 50% випадків серед астроцитом II ступеня анаплазії (4 із 8 зразків), у 23% (3 із 13 випадках) — серед астроцитом анапластичних (III) та у 62% (15 із 24) — серед гліобластом. Але наскільки хіміопрепарати будуть дійсно ефективними в лікуванні пухлин, залежить від активності численних детоксикаційних систем (зокрема глутатіонзалежних та репараційних систем) клітини. Той факт, що більш злоякісні гліоми (гліобластоми IV ступеня анаплазії) мають нижчі рівні експресії досліджуваних генів порівняно з астроцитомами III ступеня анаплазії, може пояснюватися,

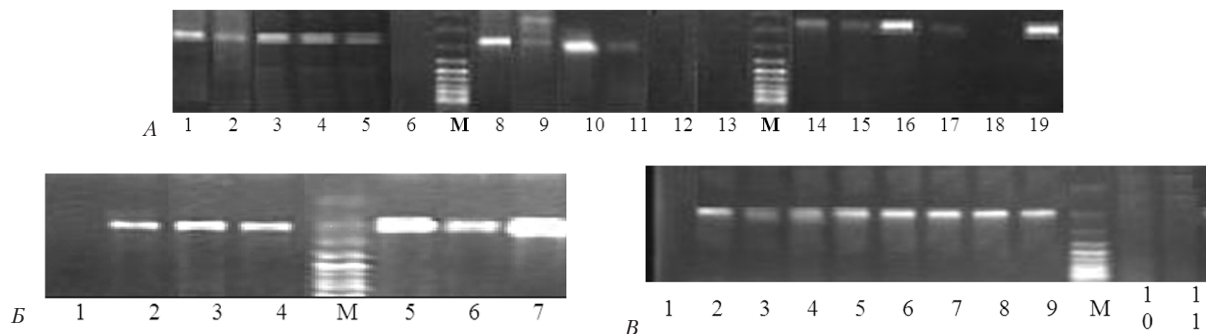


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації генів: а — LRP (240 п.н.): №1-6; MRP (260 п.н.): №8-13 та MDR1 (167 п.н.): №14-19; б — GSTP1 (198 п.н.): №2-7; в — MGMT (210 п.н.): №2-11 в пухлинах головного мозку; М — маркер молекулярної маси (100-1000 п.н.).

ТАБЛИЦЯ 1

Рівень експресії генів MDR1, MRP та LRP у гліомах головного мозку

Тип пухлини	Рівень експресії гена MDR1 (у.о./млн клітин)	Рівень експресії гена MRP (у.о./млн клітин)	Рівень експресії гена LRP (у.о./млн клітин)
Астроцитома фібрилярно-протоплазматична з атипією (I-II), n=8	0,2-14,0 (6,1±5,1)	0-4,5 (1,5±1,4)	0,1-8,2 (4,4±3,3)
Астроцитома анапластична (III), n=13	0,3-21,5 (9,9±5,9)	0-14,3 (6,1±3,7)*	0,9-27,1 (10,4±6,4)
Гліобластома (IV), n=24	0-7,5 (2,5±2,4)	0-9,5 (1,5±1,5)	0,4-10,1 (4,7±2,1)
Усього, n=45	0-21,5 (5,4±4,5)	0-14,3 (2,8±2,7)	0,1-27,1 (6,6±4,1)

Примітка: * – $p=0,05$ (тест Манна-Уїтні) порівняно з астроцитомами фібрилярно-протоплазматичними та гліобластомами.

по-перше, широкою варіабельністю експресії того чи іншого гена в різних ділянках пухлини внаслідок її біологічної гетерогенності та особливостями генетичних механізмів формування новоутворень (у первинних та вторинних гліобластомах наявні генетичні зміни, що залучають різні сигнальні шляхи). По-друге, продукти досліджуваних генів – не єдиний фактор захисту клітини. Пухлинні клітини, що пройшли відбір в організмі на здатність «обходити» контроль проліферації та диференціювання, накопичують численні механізми, які сприяють їх виживанню.

Отримані результати з генотипування тканини пухлин головного мозку за генами GSTM1 та GSTT1 (66 зразків) виявили нульовий генотип хоча б за одним із цих генів у 44 (67%) випадках, з них GSTM1«0»-генотип – у 31 (47%), GSTT1«0»-генотип – в 11 (17%), GST-«дубль нуль»-генотип – у 5 (8%) пацієнтів (табл. 2). Зіставляючи ці дані з даними літературних джерел щодо поширеності нульового генотипу GST, не можна зробити однозначних висновків відносно зв'язку між частотою виникнення новоутворень головного мозку та наявністю нульового генотипу за генами GSTT1 та GSTM1.

Порівняння генотипів GSTM1 та GSTT1 у гліомах різного ступеня анаплазії вказує на те, що наявність GSTM1«0»-генотипу частіше зустрічається в астроцитомах I-II та III ступеня злоякісності, а саме серед 10 зразків фібрилярно-протоплазматичних астроцитом (I-II) виявлено наявність GSTM1«0»-генів у 6 (60%) хворих, GSTT1«0» – не було виявлено. Дослідження анапластичних астроцитом (III) виявили GSTM1«0» в 12 (63,2%) зразках, GSTT1«0» – у 3 зразках, «дубль 0»-генотип – в 1 із 19 досліджених зразків. У групі гліобластом (IV) кількість зразків з «нульовим» генотипом GSTM1 та GSTT1 не виходила за межі контрольних.

Хоча на сьогодні відсутня чітка ясність наявності кореляції між розвитком пухлин та успадкованим GST-генотипом, частота втрачених або мутантних алелей серед етнічно різних популяцій свідчить про те, що носії цих дефектних генів мають підвищений ризик виникнення пухлин легень, органів шлунково-кишкового тракту, простати, го-

лови та шиї, клітин крові [5]. Відносно зв'язку розвитку гліом головного мозку з наявністю нульового генотипу генів GST існують суперечливі дані [6, 16]. Співставлення отриманих нами даних з наведеними в табл. 2 даними літературних джерел вказує на те, що частота GSTT1«0»-генотипу в гліомах головного мозку не перевищує середній показник серед етнічно різних популяцій, тоді як частота GSTM1«0»-генотипу значно вища в групі пацієнтів з астроцитомами, причому як низько-, так і високозлоякісними, але не в гліобластомах.

Дослідження генетичного поліморфізму ферментів родини глутатіон S-трансфераз класів M та T, що каталізують кон'югацію екзо- та ендогенних ксенобіотиків, мають також важливе значення в плані оцінки ефективності застосування різних хімотерапевтичних препаратів при лікуванні пухлин головного мозку. Найбільшої ефективності при використанні алкілюючих препаратів можна очікувати у разі відсутності ферментативної активності GSTM1 та GSTT1, а саме так званого «дубль-нуль» генотипу, викликаного гомозиготністю за дефектними алелями з делеціями цих генів.

Крім глутатіонтрансфераз класів μ та θ , значний вклад у загальну ензиматичну активність робить глутатіонтрансфераза класу π (GSTP1). Щодо гліом головного мозку, вважається, що саме GSTP1 є основною ізоформою цих ферментів. Дані, отримані нами при дослідженні експресії GSTP1, свідчать про її наявність у пухлинах головного мозку різного ступеня анаплазії (рис. 1б), а отже, необхідність кількісної оцінки даного показника в досліджуваних зразках гліом з метою виявлення можливої кореляції активності цієї форми ізоферменту з чутливістю пухлинних клітин до певних хіміопрепаратів. Серед досліджених груп гліом головного мозку (табл. 2) найвищий рівень експресії глутатіонтрансфераз класу π відзначався серед анапластичних астроцитом, найнижчий – серед астроцитом з низьким ступенем анаплазії. Середній рівень експресії даного гена в гліобластомах більш ніж у 2 рази нижчий за такий в астроцитомах анапластичних. Порівняння даних експресії GSTP1 між групами

ТАБЛИЦЯ 2

Дослідження генотипів GSTM1 та GSTT1 та рівня експресії генів GST-P та MGMT у гліомах головного мозку

Тип пухлини		GSTT1 «0»-генотип	GSTM1 «0»-генотип	Дубль «0»-генотип (GSTM1 «0»+ GSTT1 «0»)	Рівень експресії GST-P (у.о./млн клітин)	Рівень експресії MGMT (у.о./млн клітин)
	Різні етнічні групи	13-30%	35-60%	-	-	-
	Європеїдні популяції	16-25%	40-45%	-	-	-
Астроцитома фібрилярно-протоплазматична (I-II), n=10		0 (0%)	6 (60%)	0 (0%)	0,5-155,5 (44,7±38,2)	0-189,9 (123,3±42,4)
Астроцитома анапластична (III), n=19		3 (15,8%)	12 (63,2%)	1 (5,3%)	15,5-343,4 (123,5±72,6)*	0-242,4 (123,8±70,1)
Гліобластома (IV), n=37		8 (21,6%)	13 (35,1%)	4 (10,8%)	0,1-202,0 (45,0±42,0)	0-244,1 (146,4±60,4)**
Усього, n=66		11 (16,7%)	1 (47,0%)	5 (7,6%)	0,1-343,4 (68,0±56,3)	0-244,1 (131,8±61,8)

Примітки: * – $p=0,05$ (тест Манна-Уїтні) порівняно з астроцитомами фібрилярно-протоплазматичними та гліобластомами; ** – $p=0,05$ (тест Манна-Уїтні) порівняно з астроцитомами фібрилярно-протоплазматичними; # – в якості контрольних даних подані показники представників різних етнічних груп [8, 19].

гліом різного ступеня злоякісності з використанням U-критерію Манна-Уїтні виявило статистично значущі відмінності між астроцитомами фібрилярно-протоплазматичними та астроцитомами анапластичними, астроцитомами анапластичними та гліобластомами. Порівняльний аналіз низькозлоякісних гліом (I-II ступінь анаплазії) та високозлоякісних гліом (III-IV ступінь) також виявив статистично значущу різницю рівня експресії GSTP1 у цих групах. Звертають на себе увагу досить низькі середні значення рівня експресії GSTP1 у гліобластомах головного мозку порівняно з астроцитомами анапластичними, незважаючи на більш високий ступінь анаплазії перших. Однією з імовірних причин відмінності досліджених показників в астроцитомах та гліобластомах може бути наявність різниці щодо провідних генетичних порушень у цих видах гліом.

Порівняння кількості гліом з низьким та високим рівнем експресії GSTP1 у групах пухлин різного ступеня злоякісності виявило значну перевагу кількості злоякісних пухлин III та IV ступеня анаплазії з високими рівнями даних показників порівняно з пухлинами низькозлоякісними I-II ступеня анаплазії.

Наявність багатьох ізоформ ферменту глутатіонтрансферази забезпечує можливість компенсаторного функціонування тієї чи іншої форми ензиму при наявності нульового генотипу іншого. Тому очікувати клінічного ефекту хімотерапевтичних агентів слід лише при низькій активності чи повній її відсутності для всіх ізоформ GST, хоча особлива роль у нервовій тканині, як зазначалося, відводиться функціонуванню глутатіонтрансферази P.

Таким чином, аналізуючи отримані нами дані та зіставляючи їх з даними інших дослідників, слід зазначити, що спостерігається чітка тенденція до зростання рівня експресії генів глутатіонтрансфераз при високому ступені анаплазії порівняно з низьким. Уваги також заслуговує і той факт, що при наявності у хворих пухлин, однакових за клініко-морфологічними характеристиками, ми спостерігали прямо протилежні генотипи GSTM1 та GSTT1, а також рівень експресії GSTP1. Отже, кожен пацієнт потребує індивідуального підходу до вибору хіміопрепаратів при лікуванні гліом головного мозку.

Успіх застосування алкілюючих агентів у лікуванні пухлин, як зазначалося вище, значною мірою залежить від активності білків репарації ДНК, провідна роль серед яких належить O⁶-метилгуанін-ДНК-метилтрансферазі. Дослідження експресії гена MGMT у 43 зразках гліом головного мозку (рис. 1в, табл. 2) виявили її відсутність лише у 5 зразках: 1 астроцитома фібрилярно-протоплазматична, 1 астроцитома анапластична, 3 гліобластоми. Тенденція до зростання експресії даного гена в астроцитарних пухлинах спостерігається з підвищенням рівня анаплазії останніх, проте про статистично значимі відмінності не йдеться, очевидно, із-за наявності зразків з високим та низьким рівнем експресії в усіх досліджених групах. Найвищий рівень експресії даного гена серед гліом різного ступеня анаплазії виявлений у групі гліобластом (IV), що і пояснює високу резистентність цих пухлин до хімотерапевтичних препаратів.

При порівнянні співвідношення кількості зразків гліом головного мозку з високим та низь-

ким рівнем експресії MGMT було виявлено значну перевагу кількості гліобластом з високим рівнем цього показника (68,2% зразків) порівняно з астроцитомами анапластичними (38,5%) та астроцитомами низькозлоякісними (37,5%).

Таким чином, рівень експресії гена MGMT, що кодує репаративний білок метил гуанін-метилтрансферазу, є одним із прогностичних факторів виживаності пацієнтів з гліомами головного мозку та їх відповіді на алкілюючі агенти, але тільки в комплексі з іншими показниками резистентності, які повинні оцінюватися індивідуально для кожного окремого хворого.

ВИСНОВКИ

1. Дослідження факторів, відповідальних за формування стійкості гліом головного мозку до ліків, свідчать про те, що напруженість роботи детоксикаційних ферментативних систем захисту організму в кожному окремому випадку буває різною. Очевидно, це залежить від індивідуальних властивостей організму.

2. Результати молекулярно-біохімічних та генотипічних досліджень не дали однозначної відповіді відносно залежності функціонування різних систем резистентності клітини від гістологічних особливостей пухлини та ступеня її анаплазії. Проте виявлена чітка тенденція щодо зростання рівня експресії генів MDR1, MRP, LRP, GST-P та MGMT у гліальних пухлинах з високим ступенем злоякісності порівняно з низькозлоякісними гліомами:

– найбільш високий рівень експресії генів MDR1, MRP, LRP та GST-P виявлено для анапластичних астроцитом (III);

– найвищий рівень експресії гена MGMT виявлено для гліобластом (IV).

ЛІТЕРАТУРА

1. Клеменс М. Выделение эукариотической матричной РНК (мРНК). В кн.: Транскрипция и трансляция. Методы; пер. с англ. / М. Клеменс; под ред. Б.Хеймса и С.Хиггинса. – М.: Мир, 1987. – С. 254-275.
2. Чехун В.Ф. Современные взгляды на механизмы формирования лекарственной устойчивости опухолей // В.Ф.Чехун, Ю.В.Шишова // Онкология. – 2000. – Т.2, №1. – С. 11-15.
3. Bakker J. Methyl-CpG binding domain protein 2 represses transcription from hypermethylated pi-class glutathione S-transferase gene promoters in hepatocellular carcinoma cells / J.Bakker, X.Lin, W.G.Nelson // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277. – №25. – P. 22573-22580.
4. Coulondre C. Genetic studies of the lac repressor IV. Mutagenic specificity in the lacI gene of Escherich-

5. ia coli / C.Coulondre, J.H.Miller // J. Mol. Biol. – 1977. – Vol. 117. – P. 577-606.
5. De Bruin W.C.C. Expression of glutathione S-transferase α , P1-1 and T1-1 in the human gastrointestinal tract / W.C.C.De Bruin, M.J.M.Wagenmans, W.H.M.Peters // Jpn. J. Cancer Res. – 2000. – Vol. 91. – P. 310-316.
6. Hand P.A. Allelism at the glutathione S- transferase GST M3 locus – interactions with GST M1 and GST T1 as risk factors for astrocytoma / P.A.Hand, A.Inskip // Carcinogenesis. – 1996. – Vol. 17. – №9. – P. 1919-1922.
7. Gonzales F.J. The study of xenobiotic-metabolizing enzymes and their role in toxicity in vivo using targeted gene disruption / F.J.Gonzales // Toxicology Letters. – 1998. – Vol. 102. – 103. – P. 161-166.
8. Kelsey K.T. A population-based case-control study of the CYP2D6 and GSTT1 polymorphisms and malignant brain tumors / K.T.Kelsey, M.Wrensch, Z.F.Zuo [et al.] // Pharmacogenetics. – 1997. – Vol. 7. – P. 463-468.
9. Henderson C.J. Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases / C.J.Henderson, A.G.Smith, J.Ure, K.Brown [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1998. – Vol. 95. – P. 5275-5280.
10. Noonan K.E. Quantitative analysis of MDR1 (Multidrug Resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction / K.E.Noonan, C.Beck, T.A.Holzmayer [et al.] // PNAS. – 1990. – Vol. 87. – P. 7160-7164.
11. Pegg A.E. Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents / A.E.Pegg // Cancer Res. – 1990. – Vol. 50. – P. 6119-6629.
12. Pohl G. Expression of the lung resistance protein (LRP) in primary breast cancer / G.Pohl, M.Filipits, R.W.Suchomel [et al.] // Anticancer Res. – 1999. – Vol. 19. – P. 5051-5053.
13. Seelig A. Substrate recognition by P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein MRP1, a comparison / A.Seelig, X.L.Blatter, F.Wohnsland // Int. J. Clin. Pharmacol. – 2000. – Vol. 38. – P. 11-21.
14. Stella M.D. Glutathione s-transferase polymorphisms in children with myeloid leukaemia: a children's cancer group study / M.D.Stella // Cancer Epidemiol. Biomark. – 2000. – Vol. 9. – P. 563-566.
15. To-Figueras J. Polymorphism of glutathione S-transferase M3: interaction with glutathione S-transferase M1 and lung cancer susceptibility / J.To-Figueras, M.Gene, J.Gomez-Catalan, E.Pique [et al.] // Biomarkers. – 2000. – Vol. 5. – P. 73-80.
16. Trizna Z. Genetic polymorphism in glutathione S-transferase μ and θ , N-acetyltransferase, and CYP1A1 and risk of gliomas / Z.Trizna, M. De Andrade // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 1998. – Vol. 7. – №6. – P. 553-555.
17. Vaisman A. Cell cycle changes associated with formation of Pt-DNA adducts in human ovarian carcinoma cells with different cisplatin sensitivity / A.Vaisman, M.Vachenko, I.Said, S.G.Chaney // Cytometry. – 1997. – Vol. 27. – P. 54-64.

18. Valera E.T. Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia / E.T.Valera, C.A.Scrideli, R.G.P.Queiroz, B.M.O.Mori, L.G.Tone // Sao Paulo Med. J. — 2004. — Vol. 122. — №4. — P. 166-171.
19. Wiencke J.K. Population-based study of glutathione S-transferase μ gene deletion in adult glioma cases and controls / J.K.Wiencke, M.R.Wensch, R.Miike [et al.] // Carcinogenesis. — 1997. — Vol. 18. — P. 1431-1433.
20. Zambrano P. A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes / P.Zambrano, B.Segura-Pacheco, E.Perez-Cardenas, L.Cetina [et al.] // BMC Cancer. — 2005. — Vol. 5. — №1. — P. 44-56.

И.Г.Васильева, В.Д.Розуменко, А.Я.Главацкий, Н.Г.Чопик, Н.П.Олексенко, Е.С.Галанта, О.И.Цюбко. Экспрессия генов химиорезистентности в глиомах головного мозга разной степени злокачественности. Киев, Украина.

Ключевые слова: глиомы, астроцитомы, глиобластомы, головной мозг, химиорезистентность.

Целью работы было исследование особенностей функционирования основных систем химиорезистентности глиом головного мозга разной степени злокачественности для оценки возможности их учета при разработке эффективных методов лечения пациентов с данной патологией. Проведено исследование генотипов глутатионтрансфераз классов μ и θ , а также уровня экспрессии генов MDR1, MRP, LRP, GSTP1, MGMT в глиомах головного мозга (астроцитомах фибриллярно-протоплазматических, астроцитомах анапластических, глиобластомах) с использованием метода ПЦР. Полученные результаты свидетельствуют о повышении уровня экспрессии генов MDR1, MRP, LRP, GST-P и MGMT в глиальных опухолях с высокой степенью анаплазии по сравнению с низко-

злокачественными глиомами. Наиболее высокий уровень экспрессии генов MDR1, MRP, LRP и GST-P обнаружен для анапластических астроцитом (III), гена MGMT — для глиобластом (IV). Анализируя полученные данные, следует отметить, что наибольшей эффективности при лечении глиом головного мозга как низко-, так и высокозлокачественных можно достичь при учете всех возможных механизмов резистентности организма индивидуально для каждого пациента.

I.G.Vasilyeva, V.D.Rosumenko, A.Y.Glavatsky, N.G.Chopick, N.P.Olexenko, E.S.Galanta, O.I.Tsyubko. Chemoresistance gene expression in brain gliomas of different grade of malignancy. Kyiv, Ukraine.

Key words: glioma, astrocytoma, glioblastoma, brain, chemoresistance

The aim of the investigation was research of the features of main chemoresistant systems in brain gliomas of different grade of malignancy and estimation of possibility of their account at development of effective methods of treatment of patients with this pathology. The genotypes of glutathione transferases μ and θ and the level of MDR1, MRP, LRP, GSTP1, MGMT genes expression in brain gliomas (low-grade diffuse astrocytomas, anaplastic astrocytomas, glioblastomas) were investigated with the use of PCR method. Obtained results testify to the increase of level of MDR1, MRP, LRP, GST-P and MGMT genes expression in glial tumors with the high degree of malignancy as compared to glial tumors with the low degree of malignancy. Most high level of MDR1, MRP, LRP and GST-P expression was found for anaplastic astrocytomas (III), of MGMT expression — for glioblastomas (IV). It should be noted that to most efficiency at treatment of brain gliomas both low- and highmalignant it is necessary to expect at an account all possible mechanisms of organism resistance individually for every patient.

Надійшла до редакції 22.02.2010 р.